

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 10 月 21 日 (21.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/089400 A1(51) 国際特許分類:
38/19, 47/42, A61P 9/04, 9/10

A61K 38/18,

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/004164

(22) 国際出願日: 2003 年 4 月 1 日 (01.04.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko) [JP/JP]; 〒611-0024 京都府宇治市琵琶台 3-8-1 Kyoto (JP). 米田正始 (KOMEDA, Masashi) [JP/JP]; 〒602-8024 京都府京都市上京区室町通樺木町下ル大門町 2 5 6 Kyoto (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(74) 代理人: 津国 肇 (TSUKUNI, Hajime); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門 1 丁目 2 2 番 1 2 号 SVAX TSBIL Tokyo (JP).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDY FOR CARDIOMYOPATHY

(54) 発明の名称: 心筋症治療剤

(57) Abstract: It is intended to provide a composition useful in treating cardiomyopathy. A remedy for cardiomyopathy which contains HGF and a gelatin hydrogel and sustainedly releases HGF.

(57) 要約: 心筋症の治療に有用な組成物を提供する。HGF 及びゼラチンヒドロゲルを含み、HGF が徐放される、心筋症治療剤。



WO 2004/089400 A1

明 細 書

心筋症治療剤

技術分野

- 5 本発明は、HGF及びゼラチンヒドロゲルを含み、HGFが徐放される、心筋症治療剤に関する。

背景技術

- 10 HGF (hepatocyte growth factor:肝細胞増殖因子) は、1984年に中村らにより、成熟ラット初代培養肝細胞に対する増殖因子として肝再生中のラット血液から部分精製された増殖因子であり、その遺伝子はクローニングされている (Biochem Biophys Res Commun, 122, 1450(1984)、Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 83, 6489(1986)、FEBS Letter, 22, 311(1987)、Nature, 342, 440(1989)、Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 87, 3200(1990))。

- 15 その後の研究によって、HGFは、インビトロ (in vitro) において肝再生因子として障害肝の修復再生に働く増殖促進作用だけでなく、さまざまな標的細胞に対する遊走促進、形態形成誘導、抗アポトーシスなどの極めて多岐にわたる性質を有すること、それによって臓器・組織の再生・維持因子として重要な役割を果たしていること、さらに、心臓に関しては、血管新生の促進、再還流傷害の防
20 止、線維化の抑制などの心血管保護作用を有していること、それによって虚血性疾患や動脈疾患の治療または予防に大きな役割を果たしていることが明らかとなってきた (Symp. .Soc. Exp. Biol., 47, cell behavior, 227-234(1993), Proc. Natl. Acad. Sci, USA., 90, 1937-1941(1993), Circulation, 97, 381-390(1998))。

- 25 このようにHGFは、血管新生作用を始めとする種々の機能を有している。そのためHGFを医薬品として活用するために色々な試みがなされてきた。

しかし、HGFの血中における半減期は数分から10分と短いことから、その血中濃度を維持することは困難であり、また、患部へのHGF移行が十分でないという問題であった。したがって、HGFを単に水溶液の形で投与すると、投与

部位から急速に拡散され、その後排泄されてしまい、HGFの十分な生理活性効果を得ることは難しかった。

HGFの遺伝子を用いる心筋症の治療法も開発されている。この治療法は、遺伝子を主に筋肉内に投与し、筋肉内の細胞に遺伝子を取り込ませ、それによって遺伝子導入細胞から導入遺伝子の発現産生物であるタンパク質を分泌させるものである。この方法の特徴は、細胞を用いる徐放化、すなわち、血管新生誘導因子の徐放化を細胞に行わせる点にある。しかしながら、その遺伝子発現効率は、低く、さらに、遺伝子発現のレベルや期間などを制御することができないという欠点がある。また、遺伝子が導入されたことによる未知の作用発現も未だ解決されていない問題である。

要するに、上記のような問題点を解決するポイントは、血管新生誘導因子の徐放化にある。遺伝子を用いて細胞から細胞増殖因子を分泌させ、その徐放効果を得ようとする理由は、血管新生誘導因子を水溶液の形態で投与した場合には、血管新生誘導因子の作用発現は、全く認められないこと、及び、血管新生誘導因子自身を徐放化することができないことにある。

しかし、本発明のように、細胞増殖因子を徐放化することができれば、遺伝子を用いる方法を選択する意味はなく、上記のような問題点を解決することができる。

インビボ (in vivo) における有効性を高めることができる唯一の方法は、ポリマー担体にHGFを含浸させ、長時間にわたるHGFの徐放を可能にすることである。近年、種々の担体マトリックスと併用した場合には、塩基性線維芽細胞増殖因子、骨誘導タンパク質および形質転換増殖因子などいくつかの増殖因子が、in vivo において予測される生理活性を示すことがいくつかの試験で示された (Downs, E.C. et al., 1992、Miyamoto et al., 1992、Gombotx, W.R. et al., 1993)。しかし、in vivo におけるHGFの徐放に関する報告は全くない。生理的に過剰な用量でHGF溶液を注射すると、予測される生理作用を誘導することができるという研究結果がいくつかあるのみである。

また、実験動物においては、HGFが、アンギオテンシン II のブロックを介して心筋の線維化を抑制すること (Taniyama T. et al., Circulation (2000))

102: 246-252)、これとは反対に、心不全患者におけるHGF産生の障害を、アンギオテンシン変換酵素阻害剤の投与によって解消することができることも知られている (Yasuda S. et al., Hypertension(1999)33:1374-1378)。

一方、拡張型心筋症は、心筋の線維化とそれに伴う心筋細胞の変性(肥大、萎縮)を特徴とする難治性の疾患であるが、現在まで有効な処置法は見つかっていない。

本発明者らは、拡張型心筋症の処置剤について、鋭意検討を行ったところ、驚くべきことに、田畑らの開発したゼラチンハイドロゲルを用いたHGF徐放性製剤による処置が、拡張型心筋症モデルラットの心臓疾患に対する顕著な治療的効果

発明の開示

本発明の目的は、HGF及びゼラチンヒドロゲルを含み、HGFが徐放される、心筋症治療剤を提供することにある。

本発明で使用されるゼラチンとは、以下の物性：

(1) コラーゲンからのアルカリ加水分解処理によって得られる、酸性ゼラチンであり、

(2) 分子量が、SDS-PAGEの非還元条件下で約10～約20万ダルトンであり、

(3) 水溶液中のジータ電位が、約-15～約-20mVである
を有するゼラチンであり、市販のゼラチンとは異なるものである。

市販のゼラチンとして例えば、シグマ社製タイプAゼラチン、和光社製ゼラチンがあるが、水溶液中のジータ電位が以下のように異なっている。

シグマ社製タイプAゼラチン：約0～約5mV

和光社製ゼラチン：約-5～約-2mV

ジータ電位は、物質(ゼラチン)の静電的な荷電の程度を表す尺度であり、本発明におけるHGFと静電的複合体を形成するゼラチンの指標としては好適なものと考えられる。

本発明のゼラチンは牛を始めとする各種の動物種の皮膚・腱などの部分あるい

はコラーゲンあるいはコラーゲンとして用いられている物質からアルカリ加水分解して得られるものである。好ましくは、ウシの骨由来の I 型コラーゲンをアルカリ処理して調製した酸性ゼラチンであり、新田ゼラチン社の試料等電点 (IEP) 5.0 として入手することもできる。なお、酸処理して調製した塩基性ゼラチンは同じく新田ゼラチン社の試料 IEP9.0 として入手することができるが、ジータ電位は以下のように大きく相違する。

酸性ゼラチン (新田ゼラチン社試料 IEP5.0) : 約 -15 ~ 約 -20 mV

塩基性ゼラチン (新田ゼラチン社試料 IEP9.0) : 約 +12 ~ 約 +15 mV

本発明で使用されるゼラチンヒドロゲルとは、上記ゼラチンを用いて種々の化学的架橋剤と縮合させて得られるヒドロゲルのことである。化学的架橋剤としては、例えばグルタルアルデヒド、例えば EDC 等の水溶性カルボジイミド、例えばプロピレンオキサイド、ジエポキシ化合物、縮合剤を用いることができる。好ましいものとしては、グルタルアルデヒドを用いることが挙げられる。

また、ゼラチンは、熱処理又は紫外線照射によっても架橋化することもできる。

ゼラチンヒドロゲルの形状は、特に制限はないが、例えば、円柱状、角柱状、シート状、ディスク状、球状、粒子状などがある。円柱状、角柱状、シート状、ディスク状のものは、通常埋込片として用いられることが多く、また、球状、粒子状のものは注射投与も可能である。

円柱状、角柱状、シート状、ディスク状のゼラチンヒドロゲルは、ゼラチン水溶液に架橋剤水溶液を添加するか、あるいは、架橋剤水溶液にゼラチンを添加し、所望の形状の鑄型に流し込んで、架橋反応させることにより調製することができる。また、成形したゼラチンゲルにそのまま、あるいは乾燥後に架橋剤水溶液を添加してもよい。架橋反応を停止させるには、エタノールアミン、グリシン等のアミノ基を有する低分子物質に接触させるか、あるいは、pH 2.5 以下の水溶液を添加する。得られたゼラチンヒドロゲルは、蒸留水、エタノール、2-プロパノール、アセトン等により洗浄し、製剤調製に供される。

球状、粒子状のゼラチンヒドロゲルは、例えば、三口丸底フラスコに固定した攪拌用モーター (例えば、新東科学社製、スリーワンモーター、EYELA miniD.C. スターラー等) とテフロン (登録商標) 用プロペラを取り付け、フラスコと一緒に

に固定した装置にゼラチン溶液を入れ、ここにオリーブ油等の油を加えて
200～600rpm程度の速度で攪拌し、W/O型エマルジョンとし、これに
架橋剤水溶液を添加するか、ゼラチン水溶液を予めオリーブ油中にて前乳化（例
えば、ボルテックスミキサーAdvantec TME-21、ホモジナイザー、polytron
5 PT10-35 等を用いて）しておいたものをオリーブ油中に滴下し、微粒子化した
W/O型エマルジョンを調製し、これに架橋剤水溶液を添加して架橋反応させ、
遠心分離によりゼラチンヒドロゲルを回収した後、アセトン、酢酸エチル等で洗
浄し、さらに2-プロパノール、エタノール等に浸漬して架橋反応を停止させる
ことにより、調製することができる。得られたゼラチンヒドロゲル粒子は、2-
10 プロパノール、Tween 80を含む蒸留水、蒸留水等で順次洗浄し、製剤調製
に供される。

ゼラチンヒドロゲル粒子が凝集する場合には、例えば、界面活性剤などの添加
あるいは超音波処理（冷却下、1分以内程度が好ましい）等を行ってもよい。

尚、前乳化することによって、粒子サイズが20μ以下の微粒子状のゼラチン
15 ヒドロゲルを得ることができる。

得られるゼラチンヒドロゲル粒子の平均粒径は、1～1000μmであり、目
的に応じて適宜必要なサイズの粒子をふるい分けて使用すればよい。

球状、粒子状のゼラチンヒドロゲルを調製する別法として以下の方法も挙げら
れる。

20 上記の方法と同様の装置にオリーブ油を入れ、200～600rpm程度の速
度で攪拌し、ここにゼラチン水溶液を滴下してW/O型エマルジョンを調製し、
これを冷却後、アセトン、酢酸エチル等を加えて攪拌し、遠心分離によりゼラチ
ン粒子を回収する。回収したゼラチン粒子を、さらにアセトン、酢酸エチル等、
次いで2-プロパノール、エタノール等で洗浄後、乾燥させる。この乾燥ゼラチ
ン粒子を0.1% Tween 80を含む架橋剤水溶液に懸濁させ、緩やかに攪拌
25 しながら架橋反応させ、使用した架橋剤に応じて0.1% Tween 80を含む
100mM グリシン水溶液又は0.1% Tween 80を含む0.004N H
Cl等にて洗浄し、架橋反応を停止することによりゼラチンヒドロゲル粒子を調
製することができる。本法で得られるゼラチンヒドロゲル粒子の平均粒径は上記

の方法の場合と同様である。

この徐放のメカニズムは、血管形成誘導因子が、ハイドロゲル内のゼラチンに物理的に固定化されていることに基づく。この状態では、因子は、ハイドロゲルから放出されない。ハイドロゲルが分解されることによって、ゼラチン分子が、
5 水可溶性となれば、それに伴って、固定化されている血管形成誘導因子が、放出されるようになる。すなわち、ハイドロゲルの分解によって、血管形成誘導因子の徐放性を制御することができる。ハイドロゲルの分解性は、ハイドロゲル作成時での架橋程度によって変えることができる。

架橋反応条件は特に制限はないが、例えば、0～40℃、1～48時間で行う
10 ことができる。

本発明のゼラチンヒドロゲルは、その含水率が血管形成誘導因子の徐放性に大きく影響することが明らかとなっており、好ましい徐放性効果を示す含水率としては約80～99w/w%が挙げられる。さらに好ましいものとしては、約
15 95～98w/w%のものが挙げられる。この架橋度の測定可能な指標に含水率がある。含水率が大きければ架橋度は低くなり、分解されやすくなる。つまり、この含水率の値が血管形成誘導因子の徐放（徐々に放出）を左右する。

本発明のゼラチンヒドロゲルは適宜、適当な大きさ及び形に切断後凍結乾燥し滅菌して使用することができる。凍結乾燥は、例えば、ゼラチンヒドロゲルを蒸留水に入れ、液体窒素中で30分以上、又は－80℃で1時間以上凍結させた後
20 に、凍結乾燥機で1～3日間乾燥させることにより行うことができる。

ゼラチンヒドロゲルを調製する際のゼラチンと架橋剤の濃度は、所望の含水率に応じて適宜選択すれば良いが、ゼラチン濃度は、1～20w/w%、架橋剤濃度は、0.01～1w/w%が挙げられる。

本発明で使用されるHGFは公知物質であり、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で調製されたものを用いることができ、また
25 既に市販されている製品（例えば、東洋紡CodeNo. HGF-101等）を使用してもよい。HGFの製造法としては、例えば、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養上清等から分離、精製して該HGFを得ることができる。あるいは遺伝子工学的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベ

クターに組み込み、これを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えHGFを得ることもできる。(例えば、Nature, 342, 440 (1989)、特開平5-111382号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 967 (1989)などを参照)。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、酵母又は動物細胞などを用いることができる。このようにして得られたHGFは、天然型HGFと実質的に同じ作用を有する限り、そのアミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されていてもよく、また同様に糖鎖が置換、欠失及び／又は付加されていてもよい。

本発明におけるHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤とは、上記の酸性ゼラチンヒドロゲルにHGFを含浸させて得られる製剤である。HGFは塩基性タンパク質であるため、酸性ゼラチンヒドロゲルと複合体を形成するが、前述の溶液中のイオン強度変化に対するHGFの収着抑制効果を考慮すると、このHGFゼラチン(ヒドロゲル)複合体は静電的相互作用だけでなく、疎水結合等の他の相互作用が大きく寄与している。この複合体の解離定数(K_d)およびゼラチンに対するHGFの結合モル比はスキャッチャード結合モデル(Scatchard, G. 1949)にしたがって得られた。ゼラチンに対するHGFの結合モル比として、およそHGF分子7個が、酸性ゼラチン分子1個に結合している。

また、37℃の酸性ゼラチンの K_d 値は、 $5.5 \times 10^{-7} \text{M}$ であり、これは、20℃の硫酸ヘパリンの K_d 値 $1 \times 10^{-9} \sim 2.0 \times 10^{-10} \text{M}$ よりも約2～3次数大きい(Rahmoune, H et al., 1998)。これは、HGFゼラチン複合体の結合性がHGFヘパリン硫酸ほど強固でなく、緩やかであることを示している。

ゼラチンに対してHGFのモル比を約1:7以上に上げた場合には、HGFの遊離が起きやすく活性的にはほとんど遊離のHGFと同様の挙動を示す。しかし、HGFのモル比を約1:7以下に下げた場合には、HGFが吸着され解離するものが少なくなるため、HGFの見かけの活性は低下するように見える。

従って、HGFとゼラチンあるいはゼラチンヒドロゲルとの複合体は、HGFとゼラチンのモル比が種々に変化したものを作り得るが、初期バーストを回避するためには、好適なものとして、ゼラチンヒドロゲル1モルに対してHGFが約

7 モル以下のモル比の複合体が挙げられる。

なお、ゼラチンに対しては、HGFの重量比が約5倍量以下のものが好適である。さらに好適なものとしては、ゼラチンに対してHGFが約5～約1/10⁴倍量の重量比のものが望ましい。

5 本発明のHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤は、HGFの徐放性効果とHGFの安定化効果を持つため、HGFの機能を少量で長時間にわたって発揮し得る。そのため、HGFの本来的機能である血管新生の促進、再還流障害の防止、線維化の抑制などの心血管保護作用が効果的に発揮され、これら心筋症治療剤として有効に使用することができる。

10 本発明のHGFゼラチンヒドロゲル製剤は、注射用製剤として、非経口的に使用することができる。例えば、皮下、筋肉内、静脈内、体腔内、結合組織内、骨内膜あるいは障害臓器等に投与することができる。

15 本発明のHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤あるいはその複合体は、それぞれの用途に応じて適宜剤型を工夫することができる。例えば、シート状、スティック状、粒子状、ロッド状、ペースト状の剤型にして投与することができる。投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、体腔内投与、結合組織内投与、骨内膜投与などが考えられる。

20 本発明製剤中のHGFの用量は、疾患の重篤度、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常成人患者当たり約0.01～約5 μ gの範囲、好ましくは、約0.01～約0.5 μ gの範囲から投与量が選択され、これを患部またはその周辺部位に注入することができる。また1回の投与で効果が不十分であった場合は、該投与を複数回行うことも可能である。

25 本発明のHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤の適用疾患は、上記のように、心筋症である。本発明でいう心筋症とは、心筋に病変が見られるすべての疾患をいい、明らかな原因のない、心筋の異常肥大、変性、線維化を特徴とする。

適用疾患の具体例としては、拡張型心筋症又は肥大型心筋症、あるいは、特発性心筋症、原発性心筋症又は続発性心筋症を挙げることができる。好ましい疾患は、拡張型心筋症である。続発性心筋症にあつては、薬剤の副作用若しくは毒物の作用、ウイルスやバクテリアの感染症に伴う続発性心筋症が好ましい。

図面の簡単な説明

図 1 は、左室拡張末期径の変化を示す。

HGF 処理群においては、心臓の拡大が抑制されるのみならずむしろ縮小したの
5 に対し、Sham 群では心臓の拡大が見られた。

図 2 は、左室収縮末期径の変化を示す。

HGF 処理群においては、心臓の拡大が抑制されるのみならずむしろ縮小したの
10 に対し、Sham 群では心臓の拡大が見られた。

図 3 は、左室短径短縮率(心臓を輪切りにした断面における左室径の、収縮に
10 伴って生じる短縮の割合のこと)の変化を示す。

HGF 処理群では、心収縮力の改善が見られたのに対し、Sham 群では、心機能
の悪化が進んだ。

図 4 は、左室内腔面積変化率(心臓を輪切りにした断面における左室断面積の収
15 縮に伴って生じる縮小の割合のこと)の変化を示す。

HGF 処理群では、心収縮力の改善が見られたのに対し、Sham 群では、心機能
15 の悪化が進んだ。

実施例

実験方法

20 HGF の徐放が投与後約 4 週間にわたって持続するように、田畑らの方法にした
がって HGF 徐放剤を作製した。Lewis ラット(雄性、n=9、清水実験
動物株式会社より購入)の皮下にブタ心筋由来のミオシンを投与することによっ
て急性心筋炎を誘発し、その後 6 週間放置し、心筋症を誘発させ、拡張型心筋症
のモデルとした。これらを HGF 処理群(n=4)と Sham 群(n=5)とに
25 分類し、HGF 処理群には、開胸後に、HGF 徐放剤を浸潤させたゼラチンシー
トを左室前壁に付着させることによってその後の HGF の徐放を図り、Sham
群には生食をしみ込ませたゼラチンシートを左室前壁に付着させた。術後 4 週に
わたり、10~12 MHz の周波数の超音波フローベを用いた心エコーにて心臓の
大きさおよび機能を追跡した。

実験結果

HGF 処理群においては、心臓の拡大が抑制されるのみならずむしろ縮小したのに対し、Sham 群では心臓の拡大が見られた。

左室拡張末期径 (cm) :

| | 術前 | 2 週後 | 4 週後 |
|--------|-----------|-----------|------------|
| HGF 群 | 0.91±0.04 | 0.86±0.05 | 0.80±0.05 |
| Sham 群 | 0.89±0.03 | 0.88±0.03 | 0.91±0.05* |

*p=0.0043

左室収縮末期径 (cm)

| | 術前 | 2 週後 | 4 週後 |
|--------|-----------|-----------|------------|
| HGF 群 | 0.67±0.02 | 0.55±0.08 | 0.47±0.07 |
| Sham 群 | 0.68±0.01 | 0.63±0.06 | 0.74±0.05* |

*p=0.0011

また、HGF 処理群では、心収縮力の改善が見られたのに対し、Sham 群では、心機能の悪化が進んだ。

左室短径短縮率 (%) :

| | 術前 | 2 週後 | 4 週後 |
|--------|----------|----------|-----------|
| HGF 群 | 26.7±1.9 | 37.9±3.4 | 41.7±9.3 |
| Sham 群 | 24.3±2.2 | 21.1±8.7 | 17.0±2.8* |

*p=0.0014

左室内腔面積変化率 (%) :

| | 術前 | 2 週後 | 4 週後 |
|--------|----------|-----------|-----------|
| HGF 群 | 40.8±5.2 | 48.7±11.2 | 61.8±14.9 |
| Sham 群 | 43.1±3.9 | 35.0±8.0 | 30.3±3.3* |

*p=0.0010

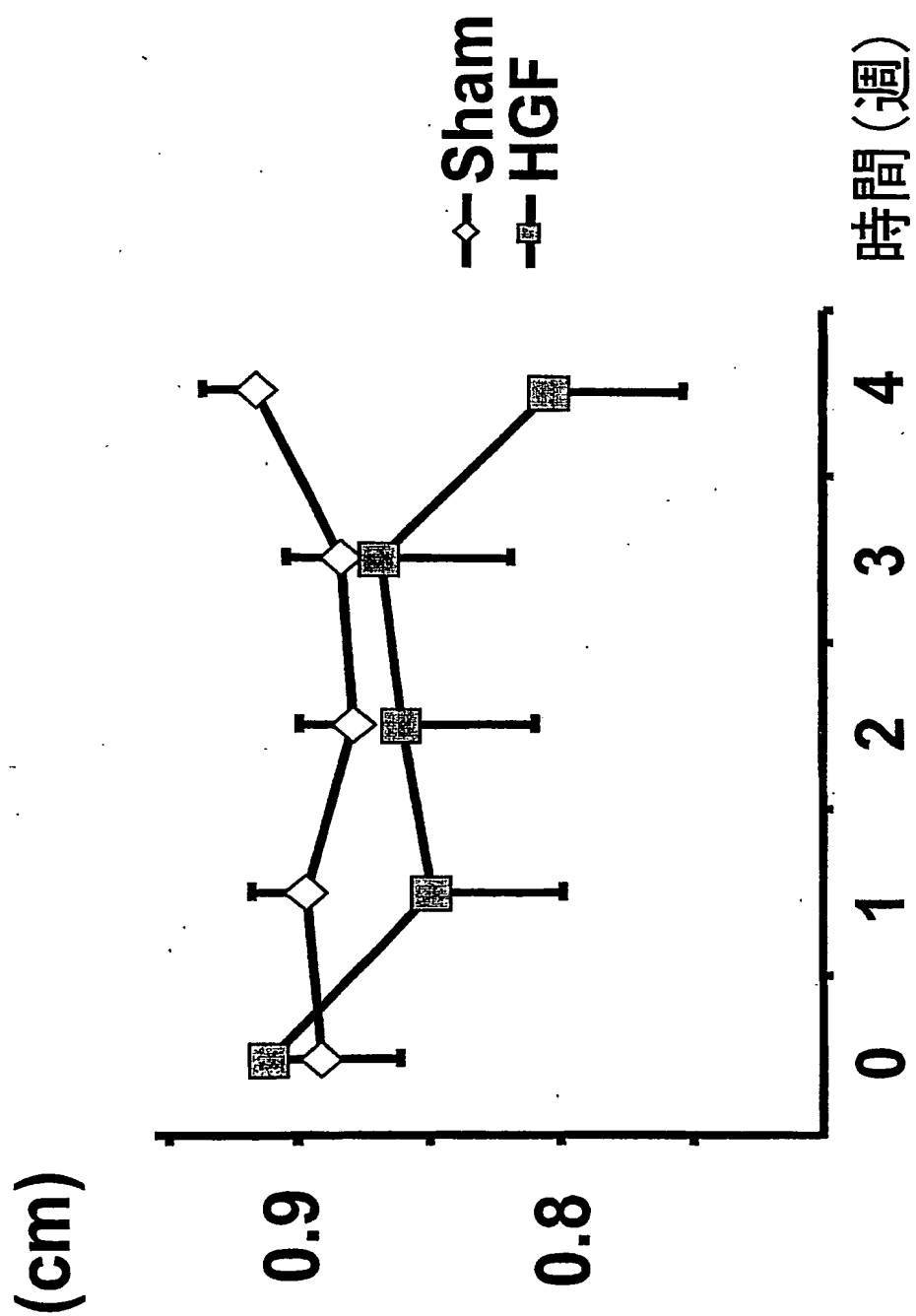
HGF 徐放剤の心筋への直接投与は、ラットにおいて、術後 4 週にわたり心臓の縮小および心収縮力の著明な改善をもたらした。この手法は、拡張型心筋症の進行を抑えるのみならず、積極的な治療効果があることが示唆された。

請 求 の 範 囲

1. HGF及びゼラチンヒドロゲルを含み、HGFが徐放される、心筋症治療剤。
- 5 2. ゼラチンが、以下の物性：
 - (1) コラーゲンからのアルカリ加水分解処理によって得られる、酸性ゼラチンであり、
 - (2) 分子量が、SDS-PAGEの非還元条件下で約10～約20万ダルトンであり、
 - 10 (3) 水溶液中のジータ電位が、約-15～約-20mVであるを有する、請求の範囲第1項記載の心筋症治療剤。
3. 心筋症が、拡張型心筋症である、請求の範囲第1項又は2項に記載の心筋症治療剤。
4. 心筋症が、肥大型心筋症である、請求の範囲第1項又は2項に記載の心筋症治療剤。
- 15 5. 心筋症が、特発性心筋症、原発性心筋症又は続発性心筋症である、請求の範囲第3項～4項のいずれか1項に記載の心筋症治療剤。

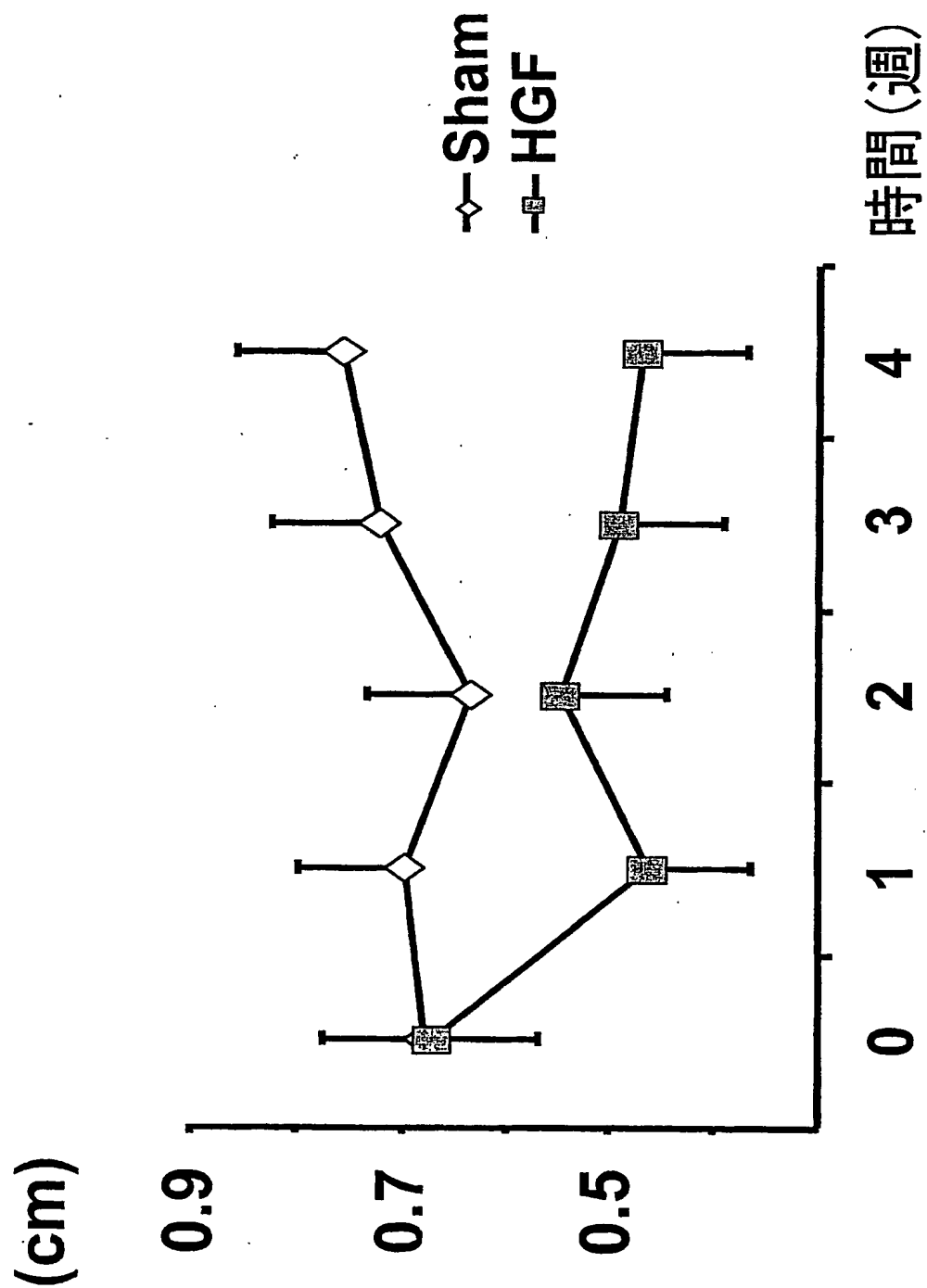
1 / 4

図 1



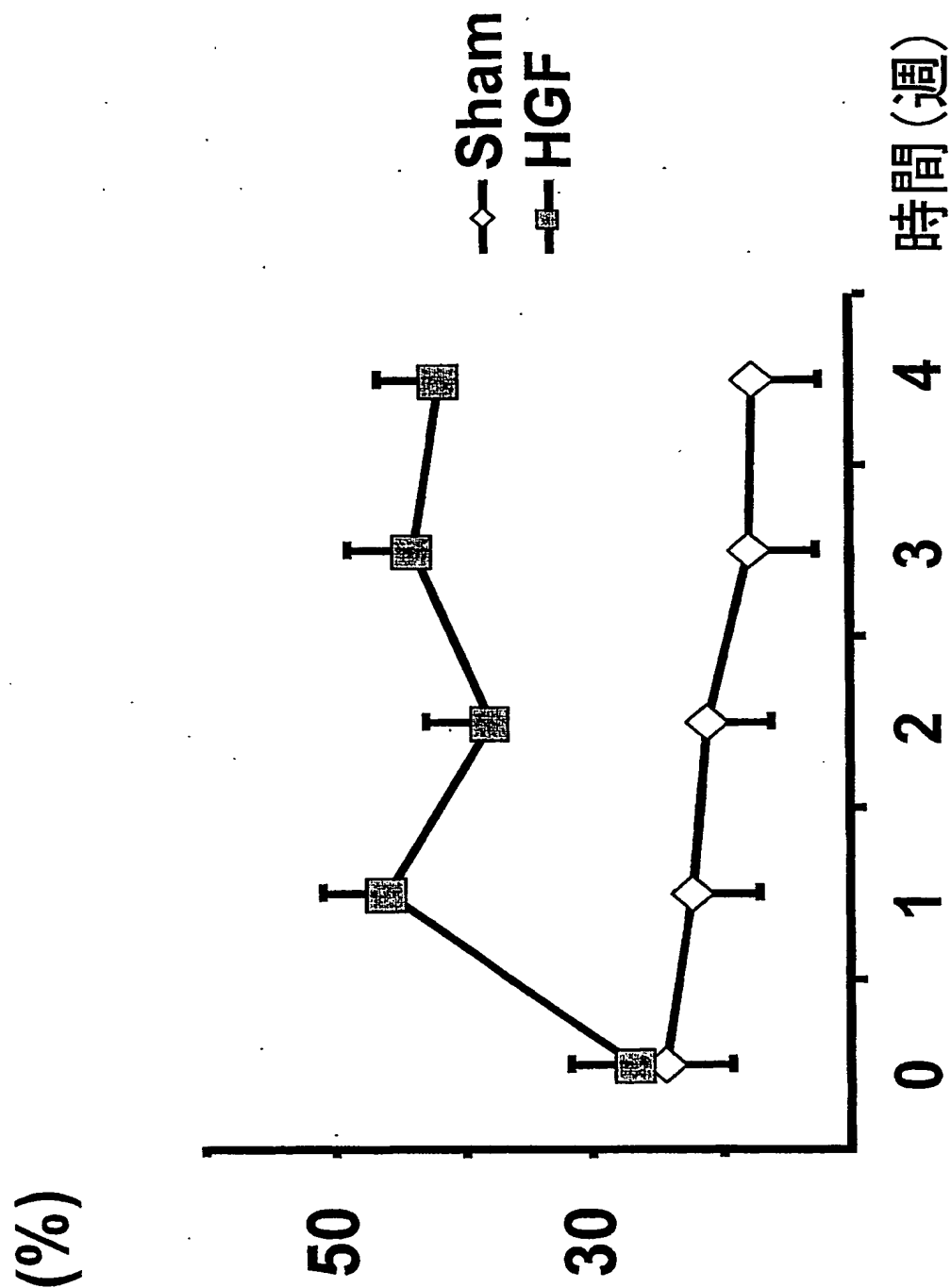
2 / 4

図 2



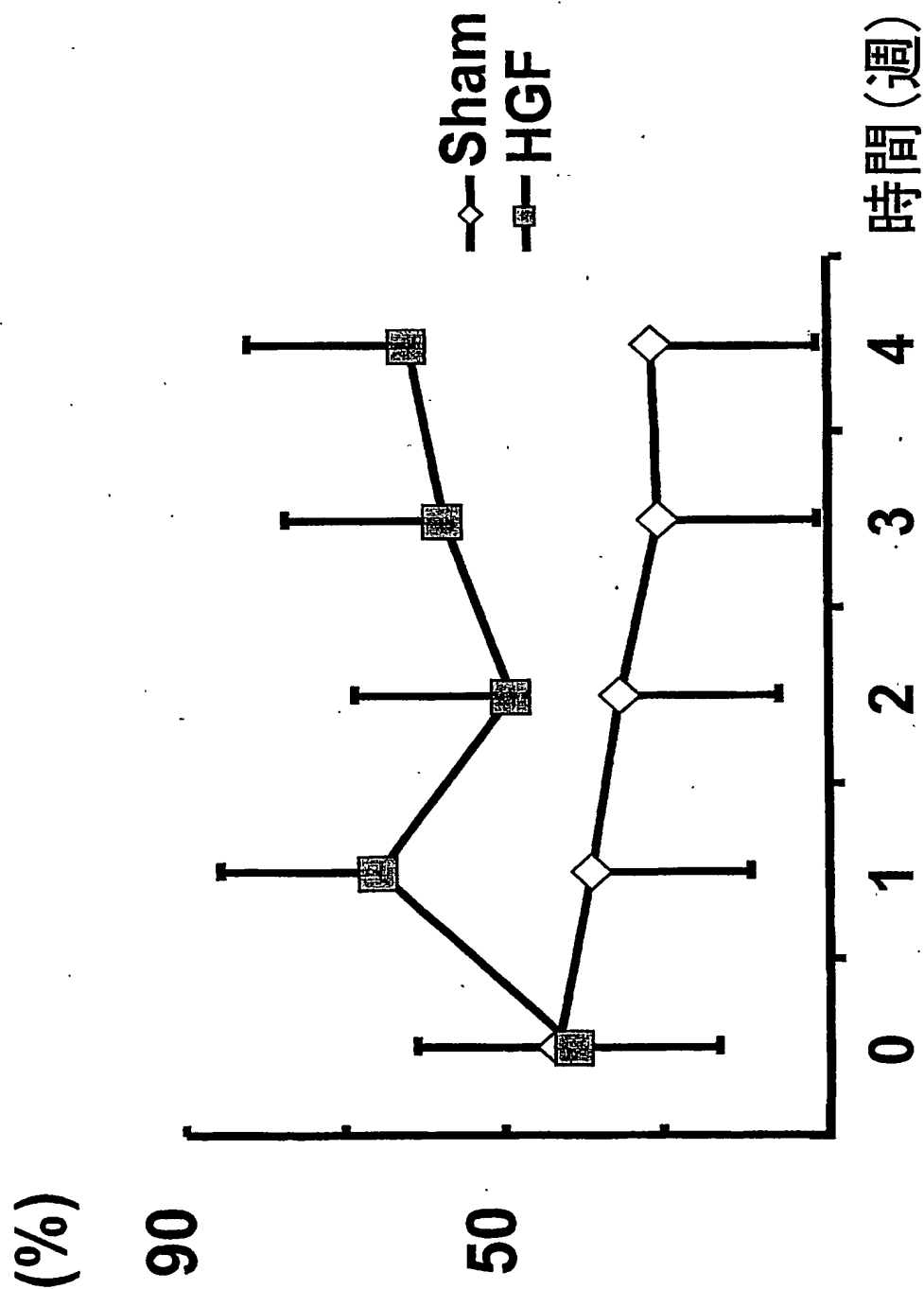
3 / 4

図 3



4 / 4

図 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04164

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/18, A61K38/19, A61K47/42, A61P9/04, A61P9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00, A61K47/42, A61P9/04, A61P9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI (DIALOG),
JOIS (JICST FILE)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | Hiroshi SAKAKIBARA et al., "Shinzo Kekkankei Ryoiki ni okeru Drug Delivery System no Oyo", Gene & Medicine, 2002, Vol.6, No.3, pages 395 to 399, full text; particularly, on and after page 397, left column 1 | 1-5 |
| X | SAKAGUCHI, G. et al., "Control-released hepatocyte growth factor (HGF) prevents myocardial fibrosis in spontaneously hypersensitive rats.", Circulation J., 01 March, 2003 (01.03.03), Vol.67, No.suppl.1, page 632 | 1-5 |
| Y | OZEKI, M. et al., "Controlled release of hepatocyte growth factor from gelatin hydrogels based on hydrogel degradation., Journal of Drug Targeting, 2001, Vol.9, No.6, pages 461 to 471 | 1-5 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
18 June, 2003 (18.06.03)

Date of mailing of the international search report
08 July, 2003 (08.07.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04164

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | WO 03/07982 A1 (TABATA Y), 30 January, 2003. (30.01.03), (Family: none) | 1-5 |
| Y | OZEKI, M. et al., "Controlled release of hepatocyte growth factor from gelatin hydrogels based on hydrogel degradation.", J. Drug Targeting, 2001, Vol.9, pages 461 to 471 | 1-5 |
| Y | Makoto OZEKI et al., "Johoka Carrier Zairyo to shite no Geratine to Kansaiho Zoshoku Inshi tono Sogo Sayo", The Society of Polymer Science, Japan Yokoshu, 18 September, 2002 (18.09.02), Vol.51, No.13, pages 3527 to 3528 | 1-5 |
| Y | Makoto OZEKI et al., "Kekkan Shinsei Sayo o Motsu Kansaiho Zoshoku Inshi no Johoka", Nihon Yakugakkai Nenkai Koen Yoshishu, 2000, Vol.120, No.4, page 27, [PD]12-66 | 1-5 |
| Y | Masaya YAMAMOTO et al., "Kekkan Shinsei o Yudo shita Kyoketsu Shinkin no Saibo Ishoku Chiryo", Ensho-Saisei, 2002, Vol.22, No.3, pages 187 to 193, full text; particularly, on and after page 190 | 1-5 |
| Y | Yasuhiko TABATA, "Saisei Igaku no Genjo to Tenbo Saibo Seicho Inshi no Johoka", Bio Clinica, 2000, Vol.15, No.14, pages 1093 to 1097, full text; particularly, on and after page 20, right column | 1-5 |
| Y | JP 2002-145797 A (KOMEDA M), 22 May, 2002 (22.05.02), (Family: none) | 1-5 |
| Y | Yasuhiko TABATA, "IV. Seitai Kogaku Gijutsu Drug Delivery System", Protein, Nucleic acid and Enzyme, 2000, Vol.45, No.13, pages 2179 to 2187, full text; particularly, page 2182, right column, lines 15 to 35; page 2183, left column IV. to page 2185, right column, line 18 | 1-5 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/18, A61K38/19, A61K47/42, A61P9/04, A61P9/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/00, A61K47/42, A61P9/04, A61P9/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPlus (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI (DIALOG), JOIS (JICSTファイル)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X | 榊原裕他. '心臓血管系領域におけるドラッグデリバリーシステムの応用' 遺伝子医学, 2002, vol. 6, no. 3, p. 395-399 文献全体、特にp. 397左欄1. 以降 | 1-5 |
| X | SAKAGUCHI, G. et al. 'Control-released hepatocyte growth factor (HGF) prevents myocardial fibrosis in spontaneously hyper sensitive rats.' Circulation J., 1 Mar. 2003, vol. 67, no. sup pl. 1, p. 632 | 1-5 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.06.03

国際調査報告の発送日

08.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保元浩

(印)

4C

8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | OZEKI, M. et al. 'Controlled release of hepatocyte growth factor from gelatin hydrogels based on hydrogel degradation.' Journal of Drug Targeting, 2001, vol. 9, no. 6, p. 461-471 | 1-5 |
| Y | WO 03/07982 A1 (TABATA Y) 2003. 01. 30 (FAMILY : NONE) | 1-5 |
| Y | OZEKI M. et al. 'Controlled release of hepatocyte growth factor from gelatin hydrogels based on hydrogel degradation.' J. Drug Targeting, 2001, vol. 9, p. 461-471 | 1-5 |
| Y | 尾関真他 '徐放化キャリア材料としてのゼラチンと肝細胞増殖因子との相互作用' 高分子学会予稿集, 18 Sep. 2002, vol. 51, no. 13, p. 3527-3528 | 1-5 |
| Y | 尾関真他 '血管新生作用をもつ肝細胞増殖因子の徐放化' 日本薬学会年会講演要旨集, 2000, vol. 120, no. 4, p. 27 [PD]12-66 | 1-5 |
| Y | 山本雅哉他 '血管新生を誘導した虚血心筋の細胞移植治療' 炎症・再生, 2002, vol. 22, no. 3, p. 187-193 文献全体、特にp. 190以降 | 1-5 |
| Y | 田畑泰彦 '再生医学の現状と展望 細胞成長因子の徐放化' Bio Clinica, 2000, vol. 15, no. 14, p. 1093-1097 文献全体、特にp. 20右欄以降 | 1-5 |
| Y | JP 2002-145797 A (KOMEDA M) 2002. 05. 22 (FAMILY : NONE) | 1-5 |
| Y | 田畑泰彦 'IV. 生体工学技術 ドラッグデリバリーシステム' 蛋白質 核酸 酵素, 2000, vol. 45, no. 13, p. 2179-2187 文献全体、特にp. 2182右欄第15-35行、p. 2183左欄IV. -p. 2185右欄第18行 | 1-5 |